

Publication of Cited Document 4



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Publication number: **0 223 960 B1**

12

## EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

49 Date of publication of patent specification: 15.07.92 61 Int. Cl.<sup>3</sup>: C12P 7/64

21 Application number: 86113088.8

22 Date of filing: 23.09.86

54 Process for the production of arachidonic acid-containing lipids.

30 Priority: 01.10.85 JP 218558/85  
31.03.86 JP 73450/86

43 Date of publication of application:  
03.06.87 Bulletin 87/23

45 Publication of the grant of the patent:  
15.07.92 Bulletin 92/29

54 Designated Contracting States:  
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

98 References cited:  
EP-A- 0 126 764  
EP-A- 0 155 420

CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 101, no. 19, 5th  
November 1984, page 539, no. 169707a, Co-  
lumbus, Ohio, US; & JP-A-59 130 191  
(AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCES AND  
TECHNOLOGY) 26-07-1984

CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, no. 5, 31st  
January 1983, page 537, no. 33069f, Colum-  
bus, Ohio, US; & JP-A-57 144 986 (AGENCY  
OF INDUSTRIAL SCIENCES AND TECHNOL-  
OGY) 07-09-1982

73 Proprietor: LION CORPORATION  
3-7, Honjo 1-chome  
Sumida-ku Tokyo(JP)

72 Inventor: Totani, Nagao  
102 Kopo Meiwa 1-12, Nakacho 3-chome  
Odawara-shi Kanagawa-ken(JP)  
Inventor: Suzuki, Kazuhiko  
17-34, Fujimigaoka 3-Chome Ninomiyamachi  
Nakagun Kanagawa-ken(JP)  
Inventor: Kudo, Toshihiro  
306, 2-2, Minamigaoka 2-chome  
Hadano-shi Kanagawa-ken(JP)

74 Representative: Neldt-Stippler, Cornelia, Dr.  
Rauchstrasse 2  
W-8000 München 80(DE)

EP 0 223 960 B1

Note: Within nine months from the publication of the mention of the grant of the European patent, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to the European patent granted. Notice of opposition shall be filed in a written reasoned statement. It shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid (Art. 99(1) European patent convention).

Rank Xerox (UK) Business Services

EP 0 223 960 B1

## Description

## BACKGROUND OF THE INVENTION

## 5 Field of the Invention

This invention relates to a process for the production of arachidonic acid-containing lipids, and particularly to a process for the production of lipids containing arachidonic acid in high content by cultivating a specific species belonging to the genus *Mortierella*.

10

## Prior Art of the Invention

Arachidonic acid is believed to be a precursor of prostaglandins, thromboxanes, prostacyclin, leukotrienes and the like which have various and strong physiological activities such as oxytocic and atonic activities, vasodilating activity and hypotensive activity, and it now attracts a good deal of public attention.

15

Arachidonic acid is widely present in the animal kingdom and has heretofore been isolated from the lipids extracted from adrenal gland, liver or sardines. However, since the content of arachidonic acid in these lipids is usually less than 5%, the yield per cell dry weight is only 0.2% or lower, and it is difficult to get the raw materials in a large scale, this extraction method cannot be useful one for the production of arachidonic acid.

20

On the other hand, many methods have been proposed for the production of arachidonic acid by cultivating various microorganisms capable of producing arachidonic acid. For instance, Japanese Patent Publication (unexamined) Nos. 64482/1977, 64483/1977 and 64484/1977 disclose a method for the production of arachidonic acid, in which an arachidonic acid-producing microorganism belonging to the genus *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Homodendrum*, *Aspergillus*, or *Rhodotorula*, is cultivated in a medium containing a carbon source such as hydrocarbon or carbohydrate to collect arachidonic acid from the culture broth. However, the content of arachidonic acid in the lipids obtained by this method is only 7.5% or below and the yield of the acid per the dry weight of the cells is less than 1%.

25

It has been reported that some of the strains belonging to the genera *Entomophthora*, *Delacrobia*, *Conidiobolus*, *Pythium* and *Phytophthora* which belong to Entomophthorales of Zygomycetes produced arachidonic acid-containing lipids, and the contents of the acid in the lipids were 27.1% based on the weight of whole fatty acids in *E. extitialis*, 19.1% in *E. ignobilis* and 18.8% in *E. thaxteriana* (D. Tyrrell, Canadian Journal of Microbiology, Vol. 13 (1967), pp. 755-760). It has also been reported that *Mortierella renispora* produced arachidonic acid-containing lipids, the contents of which in the mycelia were 4.8% and the content of arachidonic acid in the lipids was 26.7% (R.H. Haskins et al., Canadian Journal of Microbiology, Vol. 10 (1964), pp. 187-195) and that the red alga, *Porphyridium cruentum* produced arachidonic acid, the yield of which was less than 1% of the total dry weight of the cells (T.J. Ahern, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXV, pp. 1057-1070 (1983)).

30

35

Further, it has been reported that *Mortierella elongata* cultured in a liquid medium containing yeast extract and malt extract produced 0.5 to 1.0 g of arachidonic acid per liter of the liquid medium and the content of arachidonic acid in the whole fatty acids was 30.1% (S. Yamada et al. Annual Conference of the Agricultural and Chemical Society of Japan, a summary of lectures, page 502, March 10, 1986).

40

However, the contents of arachidonic acid in the total dry weight of the cells and in the lipids produced by these species as well as the yield of arachidonic acid per weight of medium used were not so high from the standpoint of practical use.

45

## SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, an object of this invention is to provide a process for the production of arachidonic acid-containing lipids by the cultivation of an arachidonic acid-producing microorganism, wherein the contents of arachidonic acid in the total dry weight of the cells as well as in the lipids extracted from the cells are so high that it is easy to collect and purify arachidonic acid and to obtain highly purified arachidonic acid in high yield.

50

The inventors of this invention studied the ability to produce arachidonic acid regarding the species of the genus *Mortierella* and found out that certain *Mortierella* species produce the lipids containing arachidonic acid in a high amount and that certain culture media can increase the total cell weight of the microorganism grown therein.

55

According to an aspect of this invention, there is provided a process for the production of arachidonic

## EP 0 223 960 B1

acid-containing lipids by cultivating a strain, of *Mortierella* species selected from the group consisting of *Mortierella alpina*, *Mortierella bainieri*, *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella minutissima*, *Mortierella verticillata*, *Mortierella hygrophila* and *Mortierella polycephala*.

According to the preferred embodiment of this invention, the strain of *Mortierella* species is cultivated in a culture medium comprising a tuber.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Specific examples of a species which can advantageously be used in this invention include *Mortierella alpina* (IFO 8568, ATCC 18268, ATCC 32221, ATCC 42430), *Mortierella bainieri* (IFO 8569), *Mortierella elongata* (IFO 8570), *Mortierella exigua* (IFO 8571), *Mortierella minutissima* (IFO 8573), *Mortierella verticillata* (IFO 8575), *Mortierella hygrophila* (IFO 5941), and *Mortierella polycephala* (IFO 6335). All of these strains are mold and listed in the strain catalogues of the Institute of Fermentation, Osaka - (IFO), Japan and American Type Culture Collection (ATCC).

The present strains can be cultivated in a solid or liquid medium by static or stir culture with shaking or under aerated agitation.

According to one of the preferred embodiments of this invention, the present strains are cultivated in a culture medium comprising a tuber such as a potato, a taro, a sweet potato, a cassava, a yam or Jerusalem artichoke, with a potato being preferred. For preparing a solid medium, a tuber is cut into about 1 cm-cubes, added with 0 to 2 times, preferably 0 to 1 time water, boiled and crushed well, to which carbohydrate is added in an amount of 0 to 20%, preferably 2 to 10% and mixed well. If water is added in an amount of more than 2 times the weight of the tuber, it is impossible to prepare a solid medium. For preparing a liquid medium, 300 to 2000 g, preferably 400 to 1000 g of the tuber cut into about 1 cm-cubes is boiled in 1000 ml of water for about 20 minutes, filtered through a cloth and diluted with distilled water to obtain 1000 ml of an extract to which carbohydrate is added in an amount of 0 to 20%, preferably 2 to 10% before sterilization of the extract. Alternatively, carbohydrate separately sterilized may be added to the extract sterilized. Examples of the carbohydrate include glucose, fructose, saccharose, molasses, saccharified woods and starch hydrolyzates.

According to the other of the preferred embodiments of this invention, the present strains are cultivated in a culture medium comprising a tuber and a divalent metal ion such as  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  is added in an amount of 0.02 to 2 g, preferably 0.05 to 1 g per l or kg of the medium and  $\text{Mg}^{2+}$  in an amount of 0.01 to 5 g, preferably 0.02 to 2 g per l or kg of the medium.

Further, there may be added a nitrogen source such as ammonia, an ammonium salt, glutamic acid, aspartic acid or urea, an inorganic salt such as potassium, sodium, iron, zinc, copper or manganese salt, a trace element and other nutrients. There may also be used a medium comprising malt-extract, peptone, yeast extract, corn steep liquor or casein acid with or without carbohydrate.

Initial pH of the culture medium is suitably in the range of 4.0 to 7.0. The cultivation is conducted at 10 to 33°C, preferably 20 to 30°C for 2 to 20 days.

The present strains grow under such aerobic condition and produce lipids most of which are contained within the cells. Therefore, the cells are separated from the culture fluid, crushed mechanically or physically and extracted with a solvent or supercritical carbon dioxide to obtain lipids containing arachidonic acid in high content.

The resulting lipids are subjected to conventional hydrolysis, esterification or interesterification to assay the content of arachidonic acid. Because of the high content of arachidonic acid in the lipids, it is possible to easily and economically purify arachidonic acid or its ester by solvent or chromatography fractionation or urea adduct separation method, as compared with the prior art. The maximum yield of arachidonic acid or its ester according to this invention reaches 28.7% based on the total dry weight of the cells which corresponds to 20 to 30 times the yield of the prior art method; the yield based on the weight of the culture medium, 2 to 13 times that of the prior art.

According to this invention, it is possible, to obtain arachidonic acid 30 times more on the base of the total dry weight of the cells than those obtained by the prior art process, or to obtain arachidonic acid-containing lipids in a yield (per the weight of the medium) 13 times higher than that of the prior art process.

Because of the high content of arachidonic acid in the lipids as well as in the medium, it becomes possible to purify arachidonic acid very easily and in a shortened time using a smaller culture tank to thereby supply highly purified arachidonic acid in a large scale at a low cost.

So far, prostaglandin related compounds, pharmacological activities of which are utilized or expected, are directly synthesized from arachidonic acid by a biochemical process using cyclooxygenase, which has an advantage in that it is unnecessary to remove various isomers unlike a chemical process. The process of

## EP 0 223 960 B1

this invention can provide highly purified arachidonic acid in a large scale at a low cost, which can contribute to a biochemical process for the production of the prostaglandin related compounds.

## EXAMPLE 1

5

A potato (600 g) peeled and cut into cubes with an edge of 1 cm was boiled in 400 ml of water for 20 minutes and passed through No. 32 mesh (0.5 mm \* 0.5 mm) to prepare potato paste (or slurry) which was mixed with 60 g of glucose and sterilized by autoclaving. Before cooled to room temperature, the paste was poured into 70 sterilized dishes of 80 mm in diameter to prepare a solid medium.

10

*Mortierella alpina* (IFO 8568), *Mortierella alpina* (ATCC 32221) and *Mortierella elongata* (IFO 8570) were inoculated in an amount of a platinum earpick into each of 30, 20 and 20 of the resulting dishes, respectively and incubated at 25 °C for 20 days.

15

Mycelia grown on 20 dishes of each for IFO 8568 and ATCC 32221 were collected. As for the remaining ten dishes for IFO 8568 and 20 dishes for IFO 8570, mycelia and pellicle together were scraped and collected with a spatula. The mycelia - (and pellicle) thus collected were immediately dried, crushed with chloroform/methanol (2:1, v/v) in a mortar and subsequently extracted with chloroform/methanol (2:1, v/v). The lipids thus obtained were converted to methyl esters with sodium methoxide. The fatty acid composition of the esters was analyzed by gas chromatography to determine the content of arachidonic acid. The results are shown in Table 1.

20

The same procedures except that 735 mg of  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  was added to 1 kg of the paste, were repeated to prepare 20 dishes of a solid medium. IFO 8568 were inoculated into the dishes and incubated at 25 °C for 20 days. Similarly, mycelia and pellicle were collected and treated. The results are also shown in Table 1.

25

Malto agar medium (22.5 g) and Sabouraud agar medium (32.5 g) (both produced by NISSUI Pharmaceutical Co., Japan) were each added to 500 ml of distilled water, sterilized by autoclaving and poured into 25 dishes, respectively to prepare agar media. *Mortierella alpina* (IFO 8568) were inoculated in an amount of a platinum earpick into the dishes and incubated at 25 °C for 20 days. Similarly, mycelia were collected, dried and treated. The results are shown in Table 1.

30

The content of arachidonic acid in the lipids of the mycelia grown on the potato media were higher than that in the lipids of the pellicle, while the cell yield of the mycelia was lower than that of the pellicle. The yield of arachidonic acid in the mycelia was about 5 g per 1 kg of the medium and that in the mycelia and the pellicle was more than 10 g, which was 5 to 13 times the yield in the liquid culture of the Suntory-Kyoto method (0.5 to 1.0 g/l).

The addition of calcium chloride increased the yields of the cells and the lipids to thereby increase the yield of arachidonic acid by 27%, which showed a remarkable effect of calcium chloride.

40

45

50

55

EP 0 223 980 B1

Table 1

Strain	Medium	Part	Dry weight of the cells per the medium weight (g/kg)	Methyl ester content per the dry weight of the cells (%)	Methyl arachidonate content in the methyl esters (%)	Methyl arachidonate content in the dry weight of the cells	Methyl arachidonate yield per the medium weight (g/kg)
IPO 8568	Potato	Mycelia	36.5	23.2	67.4	15.6	5.7
		Mycelia + Pellicle	85.8	26.6	45.1	12.0	10.3
	Potato CaCl <sub>2</sub>	Mycelia + Pellicle	95.9	27.8	49.2	13.7	13.1
	Malto agar	Mycelia	1.08	33.7	78.8	26.6	0.287
ATCC 32221	Sabouraud agar	Mycelia	9.76	6.9	31.1	2.1	0.205
	Potato	Mycelia	28.7	29.2	64.5	18.8	5.4
	Potato	Mycelia + Pellicle	84.4	33.3	28.8	9.6	8.1

## EXAMPLE 2

Extracts obtained from 100 g, 300 g or 500 g of potato were added with 30 g of glucose and diluted with distilled water to 500 ml, respectively. The resulting culture media were poured into 250 ml L-shaped

## EP 0 223 960 B1

tubes and sterilized. *Mortierella alpina* (IFO 8568) were inoculated into the media and incubated at 25°C for 20 days under shaking. The cells were collected by centrifugation, washed, dried and treated in a similar manner as in EXAMPLE 1. The results are shown in Table 2.

The higher the concentration of potato extracts, the greater the yield of arachidonic acid.

Table 2

Strain	Medium (Potato) (g/l)	Dry weight of the cells per the medium volume (g/l)	Methyl ester content per the dry weight of the cells (%)	Methyl arachidonate content in the methyl esters (%)	Methyl arachidonate content in the dry weight of the cells (%)	Methyl arachidonate yield per the medium volume (g/l)
IFO	200	6.48	36.5	42.3	15.4	0.998
8568	600	14.8	29.0	39.7	11.5	1.70
	1000	18.0	30.9	37.8	11.7	2.11

## EP 0 223 960 B1

## EXAMPLE 3

An extract obtained from 600 g of potato was added with 80 g of glucose and diluted with distilled water to 1000 ml which was poured into four L-shaped tubes in 250 ml each and sterilized. The aqueous solutions of 185 mg of  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg and 515 mg of  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dissolved in 1 ml of water and sterilized were added to the three L-shaped tubes, respectively. *Mortierella alpina* (IFO 8568) were inoculated into the four tubes and incubated at 25 °C for 20 days under shaking. The cells were collected by centrifugation, washed, dried and treated in a similar manner as in EXAMPLE 1. The results are shown in Table 3.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 0 223 960 B1

Table 3

Medium	Dry weight of the cells per the medium volume (g/l)	Methyl ester content per the dry weight of the cells (%)	Methyl arachidonate content in the methyl esters (%)	Methyl arachidonate content per the dry weight of the cells (%)	Methyl arachidonate yield per the medium volume (g/l)	Increase of the yield of methyl arachidonate (%)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 185 mg/250 ml	16.8	27.7	42.7	11.8	1.99	17.1
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 100 mg/250 ml	18.2	26.9	40.7	10.9	1.99	17.1
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 515 mg/250 ml	13.7	36.3	35.5	12.9	1.77	4.1
None	14.8	29.0	39.7	11.5	1.70	0

Table 3 shows that Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> increased the yields of methyl arachidonate, although the increases were lower than those obtained by the use in the solid media of EXAMPLE 1. The contents of methyl arachidonate in the dry weight of the cells were almost the same in the four media.

EXAMPLE 4



## EP 0 223 960 B1

An extract obtained from 200 g of potato and 20 g of glucose were diluted with distilled water, to 1000 ml and adjusted to pH5.6. The resulting medium (200 ml) was charged in a 500-ml Sakaguchi flask, into which *Mortierella alpina* (IFO 8568) and *Mortierella elongata* (IFO 8570) in an amount of a platinum earpick were inoculated and incubated at 25°C for 6 days under shaking. The resulting cells were immediately collected by centrifugation at 6000 rpm, dewatered with filter paper and weighed. One portion was used to determine the dry weight of the cells and the remaining portion was crushed with chloroform/methanol (2:1, v/v) in a mortar and extracted with chloroform/methanol (2:1, v/v). The lipids extracted was converted into methyl esters by sodium methoxide. The fatty acid compositions were analyzed by gas chromatography to thereby determine the content of arachidonic acid in the lipids. The results are shown in Table 4.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 0 223 860 B1

Table 4

Strain	Dry weight of the cells per the medium volume (g/l)	Methyl ester content per the dry weight of the cells (%)	Methyl arachidonate content in the methyl esters (%)	Methyl arachidonate content per the dry weight of the cells (%)
Mortierella alpina (IFO 8568)	6.14	29.6	36.9	10.9
Mortierella elongata (IFO 8570)	8.02	39.4	15.8	6.2

As described earlier, Haskins et al. have reported that *Mortierella renispota* produced lipids in an amount of 4.8% per the dry weight of the cells and that the content of arachidonic acid was 26.7% of the lipids, which corresponded to 1.28% ( $= 26.7\% \times 4.8\%$ ) expressed in the content of arachidonic acid per the dry weight of the cells. According to this invention, the content of arachidonic acid per the dry weight of the cells was 10.9% for alpina and 6.2% for elongata which were about 8 and 5 times that of the Haskins

## EP 0 223 960 B1

method, respectively and show that this invention is higher in the productivity than the Haskins method.

## EXAMPLE 5

6 An extract obtained from 400 g of potato was added with 40 g of glucose and 40 g of agar and diluted  
with distilled water to 2000 ml (pH 5.6) which was then sterilized by autoclaving and poured into 100  
sterilized dishes to prepare agar media. *Mortierella alpina* (IFO 8568) and *Mortierella elongata* (IFO 8570) in  
an amount of a platinum earpick were inoculated into every 50 dishes, respectively and incubated at 25° C  
for 10 days. After the cultivation, white cotton-like mycelia on the culture media were collected with a  
10 spatula and treated in a similar manner as in EXAMPLE 4. The results are shown in Table 5.

Similarly, *Mortierella alpina* (ATCC 16266, ATCC 32221, ATCC 42430), *Mortierella baintieri* - (IFO 8569),  
*Mortierella exigua* (IFO 8571), *Mortierella minutissima* (IFO 8573), *Mortierella verticillata* (IFO 8575),  
*Mortierella hygrophila* (IFO 5941) and *Mortierella polycephala* (IFO 6335) were cultivated. Analytical results  
of methyl esters obtained from the extracted lipids are shown in Table 5.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 0 223 960 B1

Table 5

Strain	Methyl ester content per the dry weight of the cells (%)	Methyl arachidonate content in the methyl esters (%)	Methyl arachidonate content per the dry weight of the cells (%)	Productivity (vs. Haskins method) Productivity (vs. other prior art method)
<i>Mortierella alpina</i> IFO 8568	35.8	80.2	28.7	22 times 29 "
<i>Mortierella alpina</i> ATCC 16266	37.0	64.8	24.0	19 " 24 "
<i>Mortierella alpina</i> ATCC 32221	34.7	70.6	24.5	19 " 23 "
<i>Mortierella alpina</i> ATCC 42430	27.9	80.1	23.3	17 " 22 "
<i>Mortierella bainieri</i> IFO 8569	38.6	28.0	10.8	8 " 11 "
<i>Mortierella elongata</i> IFO 8570	46.2	35.7	16.5	13 " 17 "
<i>Mortierella exigua</i> IFO 8571	14.3	37.6	5.4	4 " 5 "
<i>Mortierella minutissima</i> IFO 8573	33.6	45.5	15.3	12 " 15 "
<i>Mortierella verticillata</i> IFO 8575	33.0	42.3	14.0	11 " 14 "
<i>Mortierella hygrophila</i> IFO 5941	21.5	30.3	6.5	5 " 7 "
<i>Mortierella polycephala</i> IFO 6335	14.5	47.2	6.8	5 " 7 "

The content of methyl arachidonate per the dry weight of the cells of *Mortierella alpina* was 22 and 29 times higher than the Haskins method and the other prior art methods, respectively, which shows significantly high productivity of the process of this invention.

## EXAMPLE 6

45 g of malto-agar medium (produced by NISSUI Pharmaceutical Co.) was added to 1000 ml of distilled water and sterilized at 121 °C for 15 minutes by autoclaving. The resulting medium was poured into 50 sterilized dishes of 80 mm in diameter. The dishes were divided into 5 groups consisting of 10 dishes. Each dish of the 5 groups was inoculated with *Mortierella alpina* (IFO 8568), *Mortierella bainieri* (IFO 8569),

## EP 0 223 960 B1

*Mortierella elongata* (IFO 8570), *Mortierella minutissima* (IFO 8573) and *Mortierella verticillata* (IFO 8575) in an amount of a platinum earpick, respectively and incubated at 25 °C for 10 days. After the cultivation, the white mycelia on the medium were collected with a spatula and treated in a similar manner as in EXAMPLE 4. The results are shown in Table 6.

5 Similarly, *Mortierella alpina* ATCC 16268, ATCC 32221 and ATCC 42430 were incubated. The analytical results of methyl esters obtained from the lipids extracted are also shown in Table 6.

Table 6

Strain	Methyl ester content per the dry weight of the cells (%)	Methyl arachidonate content in the methyl esters (%)	Methyl arachidonate content per the dry weight of the cells (%)
<i>Mortierella alpina</i> IFO 8568	33.7	78.8	26.6
<i>Mortierella alpina</i> ATCC 16266	32.4	68.5	22.2
<i>Mortierella alpina</i> ATCC 32221	37.5	70.3	26.4
<i>Mortierella alpina</i> ATCC 42430	36.5	70.1	25.6
<i>Mortierella bainieri</i> IFO 8569	29.5	26.4	7.8
<i>Mortierella elongata</i> IFO 8570	24.8	30.0	7.4
<i>Mortierella minutissima</i> IFO 8573	15.4	53.0	8.2
<i>Mortierella verticillata</i> IFO 8575	14.0	50.9	7.1

## EP 0 223 960 B1

## EXAMPLE 7

32.5 g of Sabouraud agar medium (produced by NISSUI Pharmaceutical Co.) was added to 500 ml of distilled water and sterilized at 121 °C for 15 minutes by autoclaving. The resulting medium was poured into 5 25 sterilized dishes of 80 mm in diameter. *Mortierella alpina* (ATCC 42430) was inoculated into the medium in an amount of a platinum earpick and incubated at 25 °C for 10 days. After the cultivation, white mycelium on the medium was collected with a spatula and treated in a similar manner as in EXAMPLE 4. The results are shown in Table 7.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 0 223 960 B1

Table 7

Strain	Methyl ester content per the dry weight of the cells (%)	Methyl arachidonate content in the methyl esters (%)	Methyl arachidonate content per the dry weight of the cells (%)
Mortierella alpina ATCC 42430	23.3	65.1	15.2

For the purification of arachidonate 50 mg of methyl esters obtained by the esterification of the total lipids produced by *Mortierella alpina* was subjected to reversed phase thin layer chromatography (RP-18F produced by Merck, methanol/acetonitrile 1:1, v/v). A band at Rf 0.41 was scraped and recovered to give 35 mg of methyl arachidonate having the purity of 95.9% (the remaining 4.1% being methyl  $\gamma$ -linolenate).

## EP 0 223 960 B1

Identification of Methyl Arachidonate

Identification of methyl arachidonate (methyl eicosa -5, 8, 11, 14-tetraenoate, molecular weight 318.5) isolated from the cells of *Mortierella* species was conducted in terms of the following 5 items.

- 5 (i) Elemental analysis  
Methyl arachidonate having the purity of 95.9% - (the remaining 4.1% being methyl  $\gamma$ -linolenate) was analyzed.  
Found: C : 79.34%, H 11.21%  
Calcd: C : 79.15%, H 10.77%
- 10 (ii) Gas chromatography  
Retention times of the sample on DEGS 15% - (column temperature 180 °C), SE-30 (column temperature 170 °C) and OV101 (column temperature 170 °C) agreed well with those of the authentic sample.
- (iii) Gas-mass spectrum analysis  
Mass fragment pattern obtained by separating the sample on DEGS 10% (column temperature 200 °C) and ionizing the corresponding peak at 70 e<sup>-</sup> resembled well with that of the authentic sample, wherein the parent peak appeared at m/e 318. Fragment signals greater than m/e 200 were determined at 5 times sensitivity at which the signals of m/e 0-200 were determined.
- 15 (iv) H-NMR spectrum  
H-NMR spectrum for the sample resembled very well with that for the authentic sample. Taking the strength of three methyl protons in methyl ester group at  $\delta$  value near 3.6 ppm as the standard, there were 8 protons (5.0-5.7 ppm) which are directly bonded to a double bond nucleus and 8 protons (2.6-3.3 ppm) of methylene between double bonds, which supported the chemical structure of methyl tetraenoate.
- 20 (v) C<sup>13</sup>-NMR  
Each of signal patterns around 15-35 ppm derived from methylene carbon, around 50 ppm derived from methyl ester carbon, around 130 ppm derived from carbons forming a double bond nucleus resembled well with those of the authentic sample. Accordingly, it was confirmed that the sample was not an isomer of methyl arachidonate in terms of positions of four double bonds in arachidonate.
- 25

30 **Claims**

1. A process for the preparation of a lipid rich in its content of arachidonic acid which comprises the culturing of a fungus belonging to the genus of *Mortierella* in a growth medium, the collection of the fungal body and the isolation of the arachidonic acid, characterised therein that a lipid rich species selected from the group consisting of *Mortierella alpina*, *Mortierella bainieri*, *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella minutissima*, *Mortierella verticillata*, *Mortierella hygrophilia* and *Mortierella polycephala* is cultured.
- 35 2. A process as claimed in Claim 1, characterised therein that said *Mortierella* strain is *Mortierella alpina*.
- 40 3. A process as claimed in Claim 1 or Claim 2, characterised therein that said growth medium contains tubers as a main constituent.
4. A process as claimed in Claim 3, characterised therein that said tubers are selected from the group consisting of potato, taro, sweet potato, cassava, yam and Jerusalem artichoke.
- 45 5. A process as claimed in Claim 4, characterised therein that said tubers are potatoes.
6. A process as claimed in Claim 4, characterised therein that said growth medium is a solid medium comprising one part by weight of potato and 0 to 2 parts by weight of water.
- 60 7. A process as claimed in Claim 4, characterised therein that said growth medium is liquid and comprises an extract of 0.3 to 2 parts by weight of potato and one part by weight of water.
8. A process as claimed in Claim 6 or Claim 7, characterised therein that said growth medium further comprises 0 to 20 % by weight of carbohydrate based on the weight of the whole medium.
- 55 9. A process as claimed in any one of the preceding Claims characterised therein that said growth



## EP 0 223 980 B1

medium further comprises a divalent ion.

10. A process as claimed in any one of the preceding Claims characterised therein that said divalent ion is  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ .
11. A process as claimed in any one of the preceding Claims characterised therein that said divalent ion is contained in an amount of 0.01 to 5 g per kg in said growth medium.
12. A process as claimed in any one of the preceding Claims characterised therein that the culturing is continued in a growth medium at an initial pH of from 4.0 to 7.0 at a temperature in the range of from 10 to 33 °C for a period of from 2 to 20 days.
13. A process for the preparation of lipid rich in its content of arachidonic acid as claimed in any one of the preceding Claims, characterised therein that the fungi cultured is selected from the group consisting of *Mortierella alpina* IFO 8568, *Mortierella bainieri* IFO 8569, *Mortierella elongata* IFO 8570, *Mortierella exguia* IFO 8571, *Mortierella hygrophila* IFO 5941, *Mortierella minutissima* IFO 8573, *Mortierella polycephala* IFO 6335, *Mortierella verticillata* IFO 8575.

## Revendications

1. Procédé de préparation d'un lipide riche en acide arachidonique qui consiste à cultiver un fungus appartenant à l'espèce *Mortierella* dans un milieu de croissance, à recueillir la masse fongique et à isoler l'acide arachidonique, caractérisé en ce que l'on cultive une souche riche en lipide choisie dans le groupe suivant : *Mortierella alpina*, *Mortierella bainieri*, *Mortierella elongata*, *Mortierella exguia*, *Mortierella minutissima*, *Mortierella verticillata*, *Mortierella hygrophila* et *Mortierella polycephala*.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche de *Mortierella* précitée est la *Mortierella alpina*.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le milieu de croissance précité contient des tubercules comme constituant principal.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les tubercules précités sont choisis dans le groupe constitué de la pomme de terre, du taro, de la patate douce, du manioc, de l'igname et du topinambour.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que les tubercules précités sont des pommes de terre.
6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le milieu de croissance précité est un milieu solide comprenant une partie en poids de pomme de terre et 0 à 2 parties en poids d'eau.
7. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le milieu de croissance précité est liquide et comprend un extrait de 0,3 à 2 parties en poids de pomme de terre et une partie en poids d'eau.
8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que le milieu de croissance précité comprend par ailleurs 0 à 20 % en poids d'un carbohydrate sur base du poids de l'ensemble du milieu.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le milieu de croissance précité comprend par ailleurs un ion bivalent.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'ion bivalent précité est  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ .
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'ion bivalent précité est présent à raison de 0,01 à 5 g par kg dans le milieu de croissance précité.
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la culture est

## EP 0 223 960 B1

effectuée dans un milieu de croissance à un pH initial de 4,0 à 7,0 et à une température de l'ordre de 10 à 33° C pendant une période de 2 à 20 jours.

13. Procédé de préparation d'un lipide riche en acide arachidonique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on cultive une souche choisie dans le groupe suivant: *Mortierella alpina* IFO 8568, *Mortierella bainieri* IFO 8569, *Mortierella elongata* IFO 8570, *Mortierella exigua* IFO 8571, *Mortierella hygrophila* IFO 5941, *Mortierella minutissima* IFO 8573, *Mortierella polycephala* IFO 6335 et *Mortierella verticillata* IFO 8575.

## 10 Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Arachidonsäure enthaltenden Lipiden, wobei ein Pilz vom Genus *Mortierella* in einem Wachstumsmedium gezüchtet, das Pilzmaterial gesammelt und die Arachidonsäure isoliert werden, dadurch gekennzeichnet, daß eine lipidhaltige Spezies ausgewählt aus *Mortierella alpina*, *Mortierella bainieri*, *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella minutissima*, *Mortierella verticillata*, *Mortierella hygrophila* und *Mortierella polycephala* gezüchtet wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der *Mortierella*-Stamm *Mortierella alpina* ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Wachstumsmedium als Hauptbestandteil Knollen enthält.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Knolle aus Kartoffel, Taro, Süßkartoffel, Cassava (Maniok), Yamswurzel und Jerusalem-Artischocke ausgewählt ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Knollen Kartoffeln sind.
6. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Wachstumsmedium ein Festmedium ist und einen Gewichtsteil Kartoffel und 0 bis 2 Gewichtsteile Wasser aufweist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Wachstumsmedium flüssig ist und einen Extrakt aus 0,3 bis 2 Gewichtsteilen Kartoffel und einem Gewichtsteil Wasser aufweist.
8. Verfahren gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Wachstumsmedium ferner 0 bis 20 Gew.-% Carbohydrate, bezogen auf das Gewicht des Gesamtmediums, aufweist.
9. Verfahren gemäß irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Wachstumsmedium ferner ein divalentes Ion aufweist.
10. Verfahren gemäß irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das divalente Ion  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  ist.
11. Verfahren gemäß irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das divalente Ion in einer Menge von 0,01 bis 5 g/kg Wachstumsmedium vorliegt.
12. Verfahren gemäß irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Züchtung in einem Wachstumsmedium bei einem Anfangs-pH von 4,0 bis 7,0 bei einer Temperatur im Bereich von 10 bis 33° C über einen Zeitraum von 2 bis 20 Tagen erfolgt.
13. Verfahren zur Herstellung von Arachidonsäure enthaltenden Lipiden gemäß irgendeinem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der gezüchtete Pilz ausgewählt ist aus *Mortierella alpina* IFO 8568, *Mortierella bainieri* IFO 8569, *Mortierella elongata* IFO 8570, *Mortierella exigua* IFO 8571, *Mortierella hygrophila* IFO 5941, *Mortierella minutissima* IFO 8573, *Mortierella polycephala* IFO 6335, *Mortierella verticillata* IFO 8575.

Cited Document 4

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-12290

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和63年(1988)1月19日  
 C 12 P 7/64 7235-4B  
 //(C 12 P 7/64  
 C 12 R 1:645) 審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 アラキドン酸含有脂質の製造方法

⑯ 特 願 昭61-212168

⑰ 出 願 昭61(1986)9月9日

優先権主張 ⑱ 昭60(1985)10月1日⑲ 日本(JP)⑳ 特願 昭60-218558  
 ㉑ 昭61(1986)3月31日㉒ 日本(JP)㉓ 特願 昭61-73450

⑲ 発 明 者 戸 谷 永 生 神奈川県小田原市中町3-1-12 コーポ明和102  
 ㉒ 発 明 者 砂 崎 和 彦 神奈川県中郡二宮町富士見ヶ丘3-17-34号  
 ㉓ 発 明 者 工 藤 俊 博 神奈川県秦野市南ヶ丘2-2-2-306号  
 ㉔ 出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号  
 ㉕ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外5名

## 明 細 書

1. 発明の名称 アラキドン酸含有脂質の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

モルティエラ属のアルピナ、バイニエリ、エロンガタ、エクシグア、ミスティッシマ、ヴァーティシラタ、ハイグロフィラまたはポリセファラ種のいずれかに属する菌株を培養することによりアラキドン酸を含む脂質を生産することを特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はアラキドン酸含有脂質の製造方法に関し、更に詳細にはモルティエラ属に属する特定の菌株を培養して、アラキドン酸含量の高い脂質を製造する方法に関する。

〔従来の技術〕

アラキドン酸は、子宮筋収縮・弛緩作用、血管拡張、血圧降下作用等、強力かつ多彩な生理活性を有するプロスタグランディン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質といわれ、近年特に注目されている。アラキドン酸は動物界に広く分布しており、従来、動物副腎腺や肝臓から抽出した脂質から分類されている。しかしこれらの脂質中のアラキドン酸含有量は一般に5%以下であり、乾燥細胞重量当りの収率は0.2%以下にすぎないこと、原材料の大量入手が困難であることなどから、この抽出法はアラキドン酸の有用な製造法とはいえない。

一方、アラキドン酸生産能を有する種々の微生物

特開昭63-12290(2)

物を培養してアラキドン酸を得る方法が提案されている。たとえば特開昭52-64482号公報、同52-64483号公報、同52-64484号公報には、ペニシリウム属、クラドスポリウム属、ムコール属、フザリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、またはロードトリウム属に属するアラキドン酸生産能を有する微生物を炭化水素、炭水化物等を炭素源とする培地で培養し、培養物からアラキドン酸を採取する方法が記載されている。しかしこの方法により得られる脂質中のアラキドン酸含有量は7.5%以下であり、乾燥固体当りの収率も1%に満たない。

また接合菌類はえかび目の糸状菌であるエントモフトラ属、デラクロイキシア属、コニディオボルス属、フィティウム属およびフィトフトラ属に属する菌にアラキドン酸を生産する菌があり、エントモフトラ属のE. エクシティアリスでは脂質中の全脂肪酸の27.1%、E. イグノビリスでは19.1%、E. サクステリアナでは18.8%をアラキドン酸が占めていると報告されている(D.

ティレル(D. Tyrrell)、カナディアン・ジャーナル・オブ・マイクロバイオロジー(Can. J. Microbiol.)、Vol. 13(1967)、755-760)。さらにモルティエラ、レニスボラがアラキドン酸を生産すること、菌糸の脂質生産量は4.8%、脂質中のアラキドン酸含有量は26.7%であること(R. H. ハスキンス(Haskins)ら、Can. J. Microbiol., Vol. 10(1964)、187-195)、および、紅藻類ボルフィリディウム・クルエンタムがアラキドン酸を生産すること、その収率は、乾燥細胞重量当り1%以下であること(T. J. アヘルン(Ahern)ら、バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング(Biotechnology and Bioengineering)、Vol. XXV、1057-1070(1983))も、報告されている。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしこれら微生物の乾燥固体重量当りのアラキドン酸含量、および得られる脂質中のアラキドン酸含量はいずれも十分に高いものとはいえな

った。したがって本発明の目的は、乾燥固体重量当りのアラキドン酸含量、およびこの菌体から抽出される脂質中のアラキドン酸含量が高く、アラキドン酸の分離精製が容易で、高純度のアラキドン酸を高収率で得ることができる方法を提供することである。

(問題を解決するための手段)

本発明者は、モルティエラ属に属する菌種についてそのアラキドン酸生産能を研究したところ、特定の菌種の微生物がアラキドン酸含量の高い脂質を生産することを見出し本発明を完成するに至った。

本発明は、モルティエラ(Mortierella)属のモルティエラ・アルピナ(Mortierella alpina)、モルティエラ・バイニエリ(Mortierella bainieri)、モルティエラ・エロンガタ(Mortierella elongata)、モルティエラ・エクシグア(Mortierella exigua)、モルティエラ・ミニッシマ(Mortierella minutissima)、モルティエラ・ヴァーティシ

ラタ(Mortierella verticillata)、モルティエラ・ハイグロフィラ(Mortierella hygrophila)、またはモルティエラ・ポリセファラ(Mortierella polycephala)種のいずれかに属する菌株を培養することによりアラキドン酸を含む脂質を生産することを特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法である。

本発明に有利に使用される菌の具体例としては、モルティエラ・アルピナ(Mortierella alpina) IFO 8568、ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC 42430

モルティエラ・バイニエリ(Mortierella bainieri) IFO 8569

モルティエラ・エロンガタ(Mortierella elongata) IFO 8570

モルティエラ・エクシグア(Mortierella exigua) IFO 8571

モルティエラ・ミニッシマ(Mortierella minutissima) IFO 8573

モルティエラ・ヴァーティシラタ(Mortierella

## 特開昭63-12290(3)

- verticillata) IFO 6575  
 モルティエセラ・ハイグロフィラ(Mortierella  
 hygrophila) IFO 5941  
 モルティエセラ・ポリセファラ(Mortierella  
 polycephala) IFO 6335

等があげられる。これらの菌は大阪市の財団法人  
 菌類研究所(IFO)及び米国アメリカン・タイ  
 プ・カルチャー・コレクション(American Type  
 Culture Collection, ATCC)の菌株目録に記載さ  
 れている糸状菌である。

上記の糸状菌の培養は固液の培地を用いて、静  
 置培養、振盪培養、通気攪拌培養などにより行わ  
 れる。好ましい培地としては、ジャガイモ、サト  
 イモ、サツマイモ、キャッサバ、クワイモ、キク  
 イモなどのイモ浸出液、麦芽エキス、ペプトン、  
 酵母エキス、コーン・スティープ・リカー、カザ  
 ミノ酸などに炭水化物などを加えまたは加えずに  
 調製した培地、とくに好ましくは、ジャガイモ浸  
 出液と炭水化物の混合物あるいは麦芽エキスがあ  
 げられる。

素、その他の栄養源を添加して用いることもでき  
 る。

培養の初発 pH は、4.0~7.0 が適当であり、  
 培養温度は、10~33℃で好ましくは、20~  
 30℃で2~20日間培養される。

このような好気条件での培養により当該糸状菌  
 は培養され、生産される脂質は、大方、菌体内に  
 含まれるので培養液より菌体を分離し、機械的ま  
 たは物理的に摩砕後、溶剤、超臨界二酸化炭素な  
 どにより抽出し、アラキドン酸含有量の高い脂質  
 を得る。

得られた脂質は常法の加水分解、エステル化、  
 またはエステル交換後、アラキドン酸の含有率を  
 評価できる。また、脂質中のアラキドン酸含量が  
 高いために従来法に比較して飛躍的に容易かつ経  
 済的に溶剤やクロマトグラフィー分画、尿素付加  
 分離法等により目的のアラキドン酸あるいはアラ  
 キドン酸エステルの精製を行うことができる。ア  
 ラキドン酸あるいはアラキドン酸エステルの収率  
 は、乾燥菌体当たり、最高28.7%であり、従来の

イモ浸出液を調製するには、約1cm角に切った  
 イモを1ℓの水に300gから2000g、好ま  
 しくは、400gから1000g加えて約20分  
 煮沸後、布で濾し、蒸留水を用いて1ℓの浸出液  
 を作る。炭水化物は0~20%好ましくは、2~  
 10%、浸出液の滅菌前あるいは別途滅菌したも  
 のを浸出液滅菌後に添加する。炭水化物としては  
 例えばグルコース、フラクトース、サッカロース、  
 糖蜜、木材糖化液、デンプン水解物などがあげら  
 れる。微量添加成分として、2価の金属、例えば  
 Ca<sup>++</sup>あるいはMg<sup>++</sup>があげられる。Ca<sup>++</sup>の添  
 加量は0.02~2g/(ℓ又はkg培地)、好まし  
 くは、0.05~1g/(ℓ又はkg培地)がよく、  
 Mg<sup>++</sup>の添加量は0.01~5g/(ℓ又はkg培地)、  
 好ましくは、0.02~2g/(ℓ又はkg培地)が  
 よい。

窒素源としてアンモニア、アンモニウム塩、グ  
 ルタミン酸、アスパラギン酸、尿素などを適宜組  
 合せ、これに必要に応じてカリウム、ナトリウム、  
 鉄、亜鉛、銅、マンガンなどの無機塩と、微量要

約20~30倍の生産性を実現できることになる。  
 (発明の効果)

本発明によれば、アラキドン酸含有量の高い脂  
 質を得ることができ、従来法の約30倍の収率で  
 アラキドン酸を生産することができる。このよう  
 に脂質中のアラキドン酸含量が極めて高いので、  
 アラキドン酸の精製を非常に容易かつ短時間に行  
 うことができ、高純度のアラキドン酸を大量かつ  
 安価に供給することができる。したがってこれを  
 原料として、種々の薬理活性が利用かつ期待され  
 ているプロスタグランディン、トロンボキサン、  
 プロスタサイクリン、ロイコトリエン等を従来よ  
 り安価に合成することができる。

## 〔実施例〕

以下実施例により本発明を更に具体的に説明す  
 る。

## 実施例1

200gのジャガイモからの浸出液とグルコー  
 ス20gに蒸留水を加えて1000mlとした培  
 養液をpH5.6に調整した。その200mlを

特開昭63-12290(4)

500 ml の坂口フラスコに入れた培地にモルティエラ・アルビナ (IFO 8568)、モルティエラ・エロンガタ (IFO 8570) を個別に白金耳量接種し、25℃で6日間振盪培養した。得られた菌体は直ちに6000rpmで遠心分離して集菌し、濾紙でできるかぎり水分をとり除いたのち秤量した。ついでその一部は、乾燥重量を求めるために用い、また残りは、乳鉢内でクロロホルム/メタノール(2:1 V/V)と共にすりつぶし、引き続きクロロホルム/メタノール(2:1 V/V)で総脂質を抽出した。得られた脂質は、ナトリウムメトキサイドを用いてメチルエステル化後、その脂肪酸組成をクロマトグラフ分析してアラキドン酸の含有率を求めた。結果を表1に示す。

図	乾燥菌体重量 (g/2)	乾燥菌体重量当りのメチルエステル量 (%)	メチルエステル中のアラキドン酸含有率 (%)	乾燥菌体重量当りのアラキドン酸含有率 (%)
モルティエラ・アルビナ IFO 8568	6.14	28.6	36.9	10.9
モルティエラ・エロンガタ IFO 8570	8.02	39.4	15.8	6.2

ハスキンスらは、前述のごとくモルティエラ・レニスボラから乾燥菌体重量当り4.8%の脂質を得、その脂質中のアラキドン酸含量が26.7%であったことを報告しているが、これを乾燥菌体重量当りのアラキドン酸含量に換算すると1.28% (= 26.7% × 4.8%) になる。これに対して本発明によると、それに対応する表1中の数値は、アルビナは10.9%、エロンガタは6.2%であり、それぞれハスキンス法の約8倍と5倍を示し、本発明の生産効率が優れていることがわかる。

#### 実施例2

40.0 g のジャガイモからの浸出液にグルコース40 g と寒天40 g を加え蒸留水で2000 ml とした培養液 (pH 5.6) をオートクレーブにかけ直径80 mm の滅菌シャーレ100個に分注して寒天培地を調整した。50個ずつのシャーレにモルティエラ・アルビナ (IFO 8568) とモルティエラ・エロンガタ (IFO 8570) を個別に白金耳量接種し、25℃で10日間培養した。培養後、培地上の白綿状の菌糸をスベチュ

ラで集め、実施例1と同様の処理を行って表2の結果を得た。

上記の2株と同様にモルティエラ・アルビナ (ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC 42430)、モルティエラ・バイニエリ (IFO 8569)、モルティエラ・エクシグア (IFO 8571)、モルティエラ・ミスティッシマ (IFO 8573)、モルティエラ・ヴァーティシラタ (IFO 8575)、モルティエラ・ハイグロフィラ (IFO 5941)、モルティエラ・ポリセファラ (IFO 6335) についても培養を行い、その抽出脂質から得たメチルエステルの分析結果を表2にあわせて示す。

特開昭63-12290(5)

表 2

図	乾燥菌体重量当りのメチルエステル量(X)	メチルエステル中のアラキドン酸含有率(X)	乾燥菌体重量当りのアラキドン酸メチル含有率(X)	生産効率 (対ハスキンス法) 生産効率 (対従来生産法)
モルティエラ・アルビナ IFO 8568	35.8	80.2	28.7	22 倍 29 "
モルティエラ・アルビナ ATCC 16266	37.0	54.9	24.0	19 " 24 "
モルティエラ・アルビナ ATCC 32221	34.7	70.6	24.5	19 " 25 "
モルティエラ・アルビナ ATCC 42430	27.9	80.1	22.3	17 " 22 "
モルティエラ・バイニエリ IFO 8569	38.6	28.0	10.8	8 " 11 "
モルティエラ・エロンガタ IFO 8570	46.2	35.7	16.5	13 " 17 "
モルティエラ・エクシダ IFO 8571	14.3	37.6	5.4	4 " 5 "
モルティエラ・ミスティア IFO 8573	33.6	45.4	15.3	12 " 15 "
モルティエラ・ヴァーティシラタ IFO 8575	33.0	42.3	14.0	11 " 14 "
モルティエラ・ハイグロフィラ IFO 5941	21.5	30.3	6.5	5 " 7 "
モルティエラ・ポリセファラ IFO 6335	14.5	47.2	6.8	5 " 7 "

乾燥菌体重量当りのアラキドン酸メチルの含有率は、ハスキンス法(1.28%)と比較して特にアルビナは22倍、他の従来生産法と比較すると29倍となり、著しい生産効率の向上が期待できる。

### 実施例 3

日水製薬社製寒天培地45gを蒸留水1000mlに加えオートクレーブで121℃15分間滅菌後、直径80mmの滅菌シャーレ50個に分注して寒天培地を調整した。10個ずつのシャーレにモルティエラ・アルビナ(IFO 8568)、モルティエラ・バイニエリ(IFO 8569)、モルティエラ・エロンガタ(IFO 8570)、モルティエラ・ミスティア(IFO 8573)、モルティエラ・ヴァーティシラタ(IFO 8575)、を個々に白金耳で接種し、25℃で10日間培養した。培養後、培地上の白色の菌体をスベチュラで集め、実施例1と同様の処理を行って表3の結果を得た。

上記の5株と同様にモルティエラ・アルビナ

ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC 42430についても培養を行い、その抽出脂質から得たメチルエステルの分析結果を表3にあわせて示す。

## 特開昭63-12290(6)

表 3

図	乾燥菌体重量当りの メチルエステル量 (%)	メチルエステル中の アラキドン酸含有率 (%)	乾燥菌体重量当りの アラキドン酸含有率 (%)
モルチエセラ・アルビナ IFO 8568	33.7	78.8	26.6
モルチエセラ・アルビナ ATCC 16286	32.4	68.5	22.2
モルチエセラ・アルビナ ATCC 32221	37.5	70.3	26.4
モルチエセラ・アルビナ ATCC 42430	36.5	70.1	25.6
モルチエセラ・バイニエリ IFO 8569	29.5	26.4	7.8
モルチエセラ・エロガンタ IFO 8570	24.8	30.0	7.4
モルチエセラ・ミステイッ シマ IFO 8573	15.4	53.0	8.2
モルチエセラ・グーティ シマ IFO 8575	14.0	50.9	7.1

表 4

図	乾燥菌体重量当りの メチルエステル量 (%)	メチルエステル中の アラキドン酸含有率 (%)	乾燥菌体重量当りの アラキドン酸含有率 (%)
モルチエセラ・アルビナ ATCC 42430	23.3	66.1	16.2

## 実施例 4

日水製薬社製サブロウ寒天培地 32.5 g を蒸留水 500 ml に加え、オートクレーブで 121℃、15 分間滅菌後、直径 80 mm の滅菌シャーレ 25 個に分注して寒天培地を調整した。この培地にモルチエセラ・アルビナ ATCC 42430 を白金耳量接種し、25℃で 10 日間培養した。培養後、培地上の白色の菌糸をスパチュラで集め、実施例 1 と同様の処理を行って表 4 の結果を得た。

## 実施例 5

ジャガイモ 100 g、300 g、500 g からの浸出液のそれぞれにグルコース 30 g と蒸留水を加え、各 500 ml とした培養液を L 字管に 250 ml ずつ分注滅菌後、モルチエセラ・アルビナ (IFO 8568) を接種し、25℃下、20 日間振盪培養した。得られた菌体は遠心分離により菌体洗浄後、乾燥し、乳鉢内でクロロホルム/メタノール (2:1 V/V) と共にすりつぶし、引き続きクロロホルム/メタノール (2:1 V/V) で総脂質を抽出した。得られた脂質は、ナトリウムメトキサイドを用いてメチルエステル化後、その脂肪酸組成をクロマトグラフ分析してアラキドン酸の含有率を求め、表 5 の結果を得た。

ジャガイモの使用量が多くなるにしたがってアラキドン酸の収率も向上することがわかる。



特開昭63-12290(7)

表 5

圃	地	乾燥固 体量 (g/g)	乾燥固 体量当 りのアラキ ドン酸メ チル含有 率(%)	乾燥固 体量当 りのアラキ ドン酸メ チル含有 率(%)	乾燥固 体量当 りのアラキ ドン酸メ チル含有 率(%)	乾燥固 体量当 りのアラキ ドン酸メ チル含有 率(%)
	ジャガイモ 200g/2	6.48	36.5	42.3	15.4	0.998
	ジャガイモ 600g/2	14.8	29.0	39.7	11.5	1.70
	ジャガイモ 1000g/2	18.0	30.9	37.8	11.7	2.11

表 6

圃	乾燥固 体量 (g/g)	乾燥固 体量当 りのアラキ ドン酸メ チル含有 率(%)	乾燥固 体量当 りのアラキ ドン酸メ チル含有 率(%)	乾燥固 体量当 りのアラキ ドン酸メ チル含有 率(%)	乾燥固 体量当 りのアラキ ドン酸メ チル含有 率(%)	乾燥固 体量当 りのアラキ ドン酸メ チル含有 率(%)
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O 185mg/250ml	16.8	27.7	42.7	11.8	1.99	17.1
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O 100mg/250ml	18.2	26.8	40.7	10.9	1.90	17.1
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O 515mg/250ml	13.7	36.3	33.5	12.8	1.77	4.1
なし	14.8	29.0	39.7	11.5	1.70	0

## 実施例 6

ジャガイモ600gからの浸出液にグルコース60gを加え、蒸留水で1ℓとした培養液を4本のL字管に250mlずつ分注滅菌した。同時に、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 185mg、MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 100mg及び515mgをそれぞれ1mlの水に溶かしたものも滅菌し、個々に3本のL字管に加えた後、モルティエラ・アルビナ(IFO8568)を接種し、25℃下20日間振盪培養した。得られた菌体は遠心分離により菌液洗浄後、乾燥し、実施例5と同様の処理を行って表6の結果を得た。

Ca<sup>++</sup>とMg<sup>++</sup>は明らかに培地当りのアラキドン酸メチルの収率を向上させるが、乾燥固体重量当りのアラキドン酸メチルの含有率はほぼ一定であった。

アラキドン酸精取のため、モルティエラ・アルビナの総脂質をエステル化して得られたメチルエステル50mgを逆相系薄層板RP-18F(メルク社製)上でメタノール/アセトニトリル(1:1 V/V)を用いて展開し、R<sub>F</sub>値0.41のバンドをかきとって回収したところ、純度95.9% (4.1%はアーリノレン酸メチル)のアラキドン酸メチルが35mg得られた。

## &lt;アラキドン酸メチルの同定&gt;

本発明により得られたモルティエラ属の菌体より単離したアラキドン酸メチル(メチルエイコサ-5, 8, 11, 14-テトラエノイト 分子量318.5)は以下の5項目の分析により同定を行った。

1) 元素分析: 純度95.9%のアラキドン酸メチル(4.1%はアーリノレン酸メチル)の分析

## 特開昭63-12290(8)

結果は、炭素が79.34%、水素が11.21%であった。計算値はそれぞれ79.15%と10.77%であり、よい一致をみた。

ii) ガスクロマトグラフ分析: DEGS 15% (カラム温度190℃)、SE-30 (カラム温度170℃)、OV-101 (カラム温度170℃) の3種のカラムを用いて標準のアラキドン酸メチルの保持時間と比較したところ、非常によく一致した。

iii) ガス・マス分析: DEGS 10% (カラム温度200℃) を通過させ、該当するピークをイオン化電圧70 eVでイオン化して得たマスフラグメントパターンを標準のアラキドン酸メチルのマスフラグメントパターンと比較したところ、両者は類似しており、親ピークは318に現れた。但し、m/e 200以上のフラグメントシグナルは、m/e 0-200の範囲の感度の5倍にして測定した。

iv) H-核磁気共鳴スペクトル分析: 標準のアラキドン酸メチルのスペクトルと類似し、 $\delta$ 値

3.6 ppm 付近のメチルエステルのプロトン強度を基準として計算すると二重結合核に直接結合するプロトン (5.0 ~ 5.7 ppm) は8個、二重結合には含まれたメチレンのプロトン (2.6 ~ 3.3 ppm) は6個存在することがわかり、メチルテトラエノエイトの構造を支持した。

v)  $C^{13}$ -核磁気共鳴スペクトル分析:  $\delta$ 値15 ~ 35 ppm のメチレンの炭素に由来するシグナル、50 ppm 付近のメチルエステルの炭素に由来するシグナル、130 ppm 付近の二重結合核を形成する炭素によるシグナルの各々のパターンが標準アラキドン酸メチルのそれと類似し、当該物質がアラキドン酸メチルの二重結合に関する位置異性体でないことを確認した。